文章编号:1000-5404(2011)09-0967-03

短篇论著

hsa-mir-520 真核表达载体的构建及对 E-钙粘蛋白表达的影响

张潞渝[1],孔 璟[2],李春蕾[3],高 剑[2],叶 彬[1,2],武卫华[1,2],刘革力[1] (400016 重庆,重庆医科大学:分子医学与肿瘤中心[1],基础医学院病原生物学教研室[2],附属第一医院妇产科[3])

【摘要】 目的 构建 hsa-mir-520 真核表达载体,并转染大肠癌细胞 SW-480 细胞,检测细胞中 E-钙粘蛋白表达情况。**方法** 依据 miRBase 数据库中 hsa-mir-520 序列,设计并合成寡核苷酸片段,构建 hsa-mir-520 表达载体和对照载体。采用脂质体转染方法分别将 mir-520 表达载体、及对照质粒转染大肠癌细胞 SW-480 细胞株。采用酶切、测序检测载体构建;Western blot 检测 E-钙粘蛋白的表达。**结果** 酶切和测序表明 hsa-mir-520 真核表达载体构建成功。Western blot 结果显示与转染对照质粒和未转染的细胞相比,转染了 hsa-mir-520 重组质粒的细胞中 E-cadherin 蛋白的表达明显增加($P<0.01$),密度扫描半定量分析显示 E-cadherin 蛋白的表达增加了大约 40%。**结论** 成功构建了 hsa-mir-520 和对照的真核表达载体,hsa-mir-520 质粒转染大肠癌细胞 SW-480 后可增加 E-钙粘蛋白的表达。

【关键词】 hsa-mir-520;E-钙粘蛋白;SW-480 细胞
【中图法分类号】 R394-33;R735.34 **【文献标志码】** A

微小 RNA(microRNA,miRNA)广泛存在于真核生物中,是一类由基因组编码的非编码 RNA。miRNA 在细胞的多个过程如发育、增殖和凋亡中发挥着重要作用。miRNA 可通过与靶 mRNA 的 3′非翻译区(3′UTR)序列不完全配对的方式对相应的蛋白编码基因进行转录后水平调控[1]。一般认为 miRNA 通过沉默靶基因的表达来发挥作用[2]。有研究发现人工合成的 dsRNAs 和相应基因启动子区的结合可诱导基因表达,并将此现象称为 RNA 激活(RNAa)。RNAa 诱导了表现型的改变,靶基因的受到诱导而影响了下游基因的表达[3-4]。如同 RNAi,RNAa 可操控基因的表达而改变细胞路径和细胞生理。然而,同 RNAa 类似,miRNA 也可能正向调控基因表达。E-钙粘蛋白(E-cadherin,CDH1)的功能活性及表达程度与肿瘤细胞脱离和再附着相关,在肿瘤浸润发展中起着重要作用。通过在线的 RegRNA 软件(available at http://regrna.mbc.nctu.edu.tw)比对后发现 hsa-mir-520 与 E-cadherin 启动子区中 1 段(1 169~1 196)序列互补。为检测 miRNAs 是否可诱导 E-cadherin 基因表达,本实验构建 hsa-mir-520 真核表达载体,建立稳定转染 hsa-mir-520 的大肠癌细胞 SW-480 细胞株,并检测其对 E-cadherin 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及细胞

pGenesil-1 真核载体购自武汉晶赛公司;*E. coli* DH5α 由本室保存;大肠癌细胞 SW-480 细胞株由分子医学与肿瘤中心保存。

1.2 试剂

T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶为宝生物工程(大连)有限公司产品,质粒抽提及脱离胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,脂质体转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司,蛋白裂解液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒及化学发光检测试剂盒购自碧云天生物技术公司,兔抗人 E-cadherin 及鼠抗人 β-actin 多抗购自 Santa Cruz 公司,PVDF 膜(0.22 μm)购自 Millipore 公司,其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 hsa-mir-520 转寡核苷酸片段的设计 参照文献[5],依据 miRBase 数据库中 hsa-mir-520 序列,设计 2 条寡核苷酸片段。在序列中加入 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ酶切位点、*Sal*Ⅰ酶切位点和 RNA 聚合酶Ⅲ转录终止序列(polyT)。同时同时设计 1 对随机对照片段。hsa-mir-520 序列为:正义链:5′-GATCCCCCTCTAGAGGGAAGCACTTTCTGTTTTTTGTCGACA-3′;反义链 5′-AGCTTGTCGACAAAAAACAGAAAGTGCTTCCCTCTAGAGGGG-3′;对照序列:正义链:5′-GATCCCCCCGAAATTAGCCTATTTAAGCTTTTTTTTGTCGACA-3′;反义链 5′-AGCTTGTCGACAAAAAAAGCTTAAATAGGCTAATTTCGGGGG-3′。两个序列均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3.2 hsa-mir-520 重组质粒及其对照质粒的构建 在 pGenesil-1 质粒中,人 U6 启动子为其 RNA 聚合酶Ⅲ启动子,卡那霉素为抗性标记。DNA 单链退火后,用 T_4 连接酶将其与经 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切的 pGenesil-1 质粒进行连接,转化大肠杆菌 DH5α。挑选阳性克隆,用试剂盒抽提质粒。

1.3.3 hsa-mir-520 重组质粒和对照质粒的鉴定 分别采用内切酶 *Sal*Ⅰ和 *Pst*Ⅰ进行酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳观察酶切片段大小。对酶切结果正确的质粒进行鉴定测序。

1.3.4 细胞培养及稳定转染 大肠癌 SW-480 细胞株培养用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,37 ℃,5% CO_2 的条件

【通信作者】 武卫华,E-mail:wuwh77@gmail.com
叶 彬,电话:(023)68485898,E-mail:yebina@sohu.com

培养。转染前24 h将细胞按每孔2×10^5的细胞量接种于6孔培养板。当细胞平铺达80%左右时，按Lipofectamine™ 2000操作说明将hsa-mir-520和对照质粒分别转染SW-480细胞，并设立空白对照。24 h后观察转染效果，并更换为选择性培养基（10%小牛血清的RPMI1640中G418含量为600 μg/ml）进行培养，隔天换液。2周后出现抗性克隆，挑单克隆再以G418含量为400 μg/ml的选择性培养基进行培养，以建立稳定转染的细胞系。收集稳定转染的细胞系，采用细胞DNA提取试剂盒DNA提取。根据pGenesil-1.1载体的GFP基因片段设计PCR引物，上游5′-CGGGAACTACAAGACACG-3′，下游5′-AACTCAAGAAGGACCATG-3′，预计大小为360 bp。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后观察结果。

1.3.5 Western blot检测 按照碧云天RIPA裂解液操作说明提取蛋白。配制6% SDS-PAGE凝胶，测定蛋白浓度后取20 μg蛋白上样，电泳；转膜后室温封闭2 h，加入一抗（E-cadherin，1∶400；β-actin，1∶400），4 ℃过夜；TBST洗膜后分别加HRP标记的羊抗兔（1∶1 000）、羊抗IgG（1∶1 000），37 ℃孵育1 h后，用TBST洗膜，采用ECL化学发光显色并观察结果。采集图像后用Quantity One进行测量。

1.4 统计学分析

使用SPSS 11.3统计软件进行分析，组间数据比较采用*t*检验。

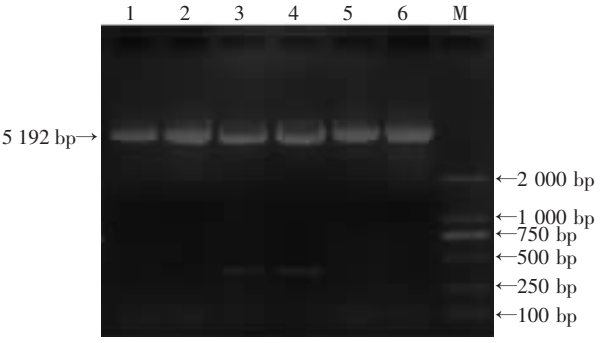
2 结果

2.1 hsa-mir-520及对照质粒的酶切与测序鉴定

在pGenesil-1质粒hU6启动子外侧有内切酶*Sal* Ⅰ酶切位点，在设计的寡核苷酸插入片段中也有内切酶*Sal* Ⅰ酶切位点。根据pGenesil-1的序列推测重组质粒经内切酶*Sal* Ⅰ酶切后可切下一个350 bp左右的小片段；而pGenesil-1的序列中没有内切酶*Pst* Ⅰ酶切位点，内切酶*Pst* Ⅰ不能将重组切开。重组质粒经酶切后电泳。内切酶*Sal* Ⅰ酶切后在250～500 bp可见1条带；而*Pst* Ⅰ酶切仅可见线性载体条带（图1），酶切结果表明重组质粒构建初步成功。对酶切鉴定的质粒进行基因测序，结果显示重组质粒序列448～488位碱基与设计的hsa-mir-520序列完全一致，重组质粒序列477～517位碱基与设计的对照序列完全一致，证实重组质粒构建成功。

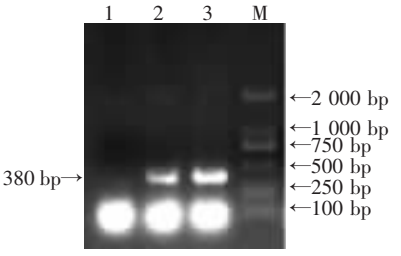
2.2 脂质体转染大肠癌细胞SW-480效果

pGenesil-1质粒转染细胞后可表达EGFP蛋白，大肠癌细胞SW-480转染24 h后，用荧光显微镜观察转染情况见图2。可以看到转染hsa-mir-520和对照质粒的大肠癌细胞SW-480细胞株，表达荧光的细胞数量较多，转染效率均高于60%，而未转染细胞无荧光表达。对稳定转染的细胞提取DNA进行质粒携带的EGFP基因片断扩增，结果可以从细胞的DNA中扩增出380 bp的片段（图3）。表明阳性克隆的细胞系中有质粒DNA的整合。



M：DNA标准；1：hsa-mir-520质粒；2：对照质粒；3：*Sal* Ⅰ酶切hsa-mir-520质粒；4：*Sal* Ⅰ酶切对照质粒；5：*Pst* Ⅰ酶切hsa-mir-520质粒；6：*Pst* Ⅰ酶切对照质粒

图1 重组mir-520质粒及对照质粒的酶切鉴定



1：未转染的SW-480细胞；2：转染对照质粒的SW-480细胞；3：转染hsa-mir-520质粒的SW-480细胞；M：DNA标准

图3 PCR鉴定阳性克隆细胞株的电泳结果

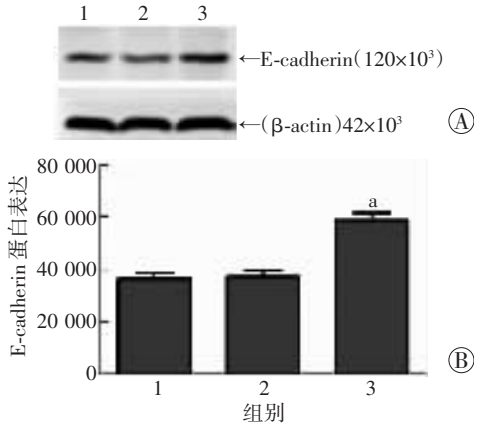
2.3 Western blot检测E-cadherin蛋白的表达水平

提取的细胞蛋白经过电泳、转膜、抗体孵育和化学发光后用Bio-Rad凝胶成像仪摄取凝胶图像（图4A）。结果显示：与转染对照质粒和未转染的细胞相比，转染了hsa-mir-520重组质粒的SW-480中E-cadherin蛋白的表达明显增加（$P<0.01$），密度扫描半定量分析显示E-cadherin蛋白的表达增加了大约40%（图4B）。转染对照质粒和未转染的SW-480相比，其E-cadherin蛋白的表达无统计学意义（$P>0.05$）。



A：转染hsa-mir-520质粒的SW-480细胞；B：转染对照质粒的SW-480细胞；C：未转染的SW-480细胞

图2 脂质体转染大肠癌细胞SW-480 24 h荧光显微镜观察 （×100）



1:空白 SW-480 细胞 2:对照质粒转染细胞 3:重组 hsa-mir-520 质粒转染细胞　A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果
a $P<0.05$,与 1、2 组比较

图 4　Western blot 检测各组细胞 E-cadherin 蛋白的表达水平

3　讨论

1993 年 Lee 等[6]首次在线虫中发现小 RNAs 可调控虫体的发育过程。随着越来越多小分子 RNA 被研究者发现,随后这些小分子 RNA 统称为 miRNA。miRNA 不编码蛋白质,本身也不具有开放阅读框(OFR)。成熟的 miRNA 其主要功能是在转录后水平负性调控基因表达[7],其有 3 种作用模式:一是不完全互补结合到靶基因 mRNA 的 3′非编码区(3′UTRs),以未知方式抑制蛋白翻译而不改变 mRNA 丰度[8];二是完全互补结合到靶基因 mRNA 的 3′UTR,以类似于 siRNA 的方式介导靶基因 mRNA 的降解;三是由上述 2 种模式综合作用。也有研究[9]显示 miRNA 还可能通过将 mRNA 从胞浆中转移至 P-body,调节靶标基因表达水平。Place 等[10]研究表明了 miRNA 可能具有诱导基因表达的功能。

目前研究 miRNA 功能所采用的主要方法有3 种:真核表达载体、体外转录以及直接合成。RNA 特别容易受 RNA 酶污染而降解;而人工合成价格较昂贵且使用次数有限,因此后 2 种方法的应用较有限。对于长其研究及保存 miRNA 多采用真核表达载体。

Takamizawa 等[11]使用 pH1-RNApuro 质粒有效地上调了 miRNA 基因的表达。本实验选用 pGenesil-1 质粒载体。该质粒同样为 siRNA 真核表达载体,带有 hU6 启动子,可将下游插入的 DNA 序列转录成单链 RNA,同时该质粒带有卡那霉素及新霉素抗性基因,分别用于原核细胞及真核细胞的筛选。此外,还带有一个 EGFP 基因,便于对质粒转染和稳定筛选进行直接观察。该质粒可表达绿色荧光蛋白,其表达即可衡量质粒转染效率以及表达情况,又可间接反映 miRNA 表达情况。

有研究表明,转染 pre-mir 和 mature-mir 均可诱导基因的表达[10]。因此,本实验人工构建了成熟 hsa-miR-520 的真核表达载体,并通过脂质体转染方法转染大肠癌细胞 SW-480。Western blot 实验发现细胞 E-cadherin 表达增加,表明 E-cadherin 表达量的增加可能和 miR-520 相关。由于 E-cadherin 介导的粘附系统在肿瘤的发生、发展中起重要作用。因此通过调控 E-cadherin 蛋白基因的来控制肿瘤细胞的生物学行为可能为肿瘤的治疗带来新的希望。本实验构建的hsa-miR-520 重组质粒将在下面的实验中发挥重要作用。

参考文献:

[1] Standart N, Jackson R J. MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs *in vitro* by inhibiting initiation and promoting deadenylation[J]. Genes Dev, 2007, 21(16):1975 - 1982.

[2] He L, Hannon G J. MicroRNAs:small RNAs with a big role in gene regulation [J]. Nat Rev Genet, 2007, 5(7):522 - 531.

[3] Li L C, Okino S T, Zhao H, *et al*. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(46):17337 - 17342.

[4] Janowski B A, Younger S T, Hardy D B, *et al*. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs[J]. Nat Chem Biol, 2007, 3(3):166 - 173.

[5] 何晓燕,陈俊霞,欧阳溪, 等. Let-7a 表达质粒的构建及其对肺癌 A549 细胞 k-Ras 蛋白表达的抑制作用[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(11):2427 - 2431.

[6] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5):843 - 854.

[7] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms:growth, death, fat, stress, and timing[J]. Cell, 2003, 113(6):673 - 676.

[8] Bagga S, Bracht J, Hunter S, *et al*. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation[J]. Cell, 2005, 122(4):553 - 563.

[9] Aukerman M J, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes[J]. Plant Cell, 2003, 15(11):2730 - 2741.

[10] Place R F, Li L C, Pookot D, *et al*. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(5):1608 - 1613.

[11] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, *et al*. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival[J]. Cancer Res, 2004, 64(11):3753 - 3756.

(收稿 2010-11-05 修回 2011-01-12)
(编辑　汪勤俭)